IGF-I ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-I)
(IGFBP-blockiert)

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

Human Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)
(IGFBP-blocked)

English

Europäische Union / European Union:
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

CE MD 2-8°C Σ 96 wells

REF **E20**

mediagnost®
Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

: Aspenhaustr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • http://www.mediagnost.de

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SI/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas exspirácie/ Doba exspirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectaţi instrucţiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnumme/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталожен номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conţinut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepať/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
MTP	Miktrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrska plošča/ Mikrotitrauslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstitueren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
DET	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjuguée/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antyciał/ Antitest páros/ Protilátkový konjugát/ Protilátkový konjugát/ Антитяло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuşi din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti

EC	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuşi din enzime/ Encima konjugat/ Entsymi konjugaatti
SB	Sample Buffer/ Probenpuffer/ Tampon d'échantillon/ Buffer campione/ Tampón de muestra/ Tampão de amostra/ Monsterbuffer/ Prøvebuffer/ Provbuffert/ Bufor próbki/ Mintapuffer/ Pufr na vzorky/ Vzorkovací pufr/ Примерен буфер/ Proovipuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος/ Tampon de probă/ Vzorčni puffer/ Näytepuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riediť / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluaţi / Razredčiti / Laimennetaan
CAL	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibrateur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
CTR1 / CTR2	Control X/ Kontrolle X/ Contôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufra/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопиращ разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluţie de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with cover foil/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkleeplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiţi placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure lábsorbance en léspace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur dónde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referinţă ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucţiuni internaţionale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavităţile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung 5

1 ZWECKBESTIMMUNG 5

2 EINFÜHRUNG 5

3 TESTPRINZIP 7

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 8

5 PROBEN 9

6 MATERIALIEN 10

7 TECHNISCHE HINWEISE 11

8 TESTDURCHFÜHRUNG 12

9 QUALITÄTSKONTROLLE 13

10 AUSWERTUNG 13

11 EINSCHRÄNKUNGEN 15

12 REFERENZWERTE 16

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG 17

14 VERGLEICHSSTUDIEN 21

15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN 22

ENGLISH - Instructions for use 24

1 INTENTED USE 24

2 INTRODUCTION 24

3 PRINCIPLE 26

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 27

5 SAMPLES 28

6 MATERIALS 29

7 TECHNICAL NOTES 30

8 ASSAY PROCEDURE 31

9 QUALITY CONTROL 32

10 EVALUATION OF RESULTS 32

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE 34

12 REFERENCE VALUES 34

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 36

14 ASSAY COMPARISON 39

15 SCIENTIFIC APPLICATION 40

16 LITERATUR / REFERENCES 41

17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION 43

18 ASSAY PROCEDURE 44

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung

IGF-I ELISA E20	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/20
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Spezifische monoklonale Antikörper und polyklonale hochaffine Antisera.
Kreuzreaktivität mit IGF-II, Insulin, C-Peptid	< 0,1%
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Kalibratoren	5 Einzel-Kalibratoren: 2 - 50 ng/mL, rekombinantes humanes IGF-I
Referenzmaterial	Internationaler Standard WHO/NIBSC 02/254
Assay-Bereich	0,09 – 1050 ng/mL
Kontrollen	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	human serum / plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:21
Analytische Sensitivität	ø 0,09 µg/L
Intra- / Interassay Variation	ø < 10 %
Referenz Werte	Blum W.F., Schweizer R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB (ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-I) in menschlichem Serum oder Plasma. In Kombination mit Wachstumsverzögerung und anderen klinischen Symptomen können die Ergebnisse dieses Testsystems als zusätzliche Information verwendet werden, um Störungen der Wachstumshormonachse zu beurteilen.

2 EINFÜHRUNG

Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und spezifischer Funktionen vieler Zelltypen (1-3). IGF-I ist identisch mit Somatomedin C (Sm-C) (4) und hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (5). Seine wichtigsten Regulatoren sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung (6), wenn auch seine Synthese in spezifischen Geweben durch eine Vielzahl troper Hormone und anderer Peptid-Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Sieben Klassen von Bindungsproteinen sind derzeit bekannt (7,8,22). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Ein Hauptproblem bei der Messung von IGF-I resultiert aus der Interferenz mit IGFBPs im Assay. Die direkte Bestimmung in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, weil auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF-I/IGFBP-3-

Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des IGF-I der Messung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Verhältnis von IGF-I zu IGFBPs in der Probe kommt es zu Interferenzen: (s. beispielhaft in Abb.1)

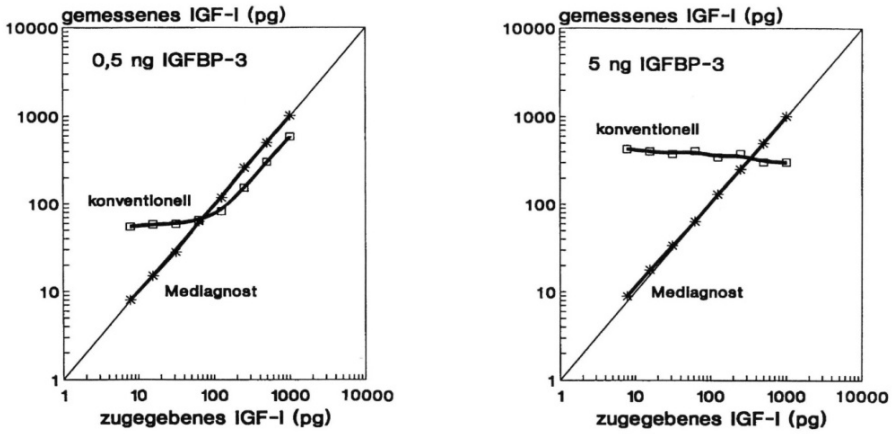


Abb. 1. Interferenz von IGFBP bei IGF-I-Messungen. Bekannte IGF-I-Konzentrationen wurden in Gegenwart von 0,5 ng (links) bzw. 5 ng (rechts) hIGFBP-3 mit einem konventionellen RIA (□) oder dem IGFBP-blockierten RIA (*) gemessen.

Deshalb wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um vor der eigentlichen Messung IGF-I von seinen Bindungsproteinen abzutrennen: (a) Ausschlusschromatographie unter sauren Bedingungen, (b) Festphasenextraktion und (c) Säure-Alkohol-Extraktion (2,12,13). Diese Methoden sind jedoch entweder umständlich und zeitaufwendig oder führen zu unvollständiger und vor allem nicht reproduzierbarer Wiederfindung. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Säure-Alkohol-Extraktion (13,14). Infolge von Co-Präzipitation ergibt sie jedoch nur eine Ausbeute von 70 - 80 % des gebundenen IGF-I. Die gemessenen Absolutwerte nach einem solchen Extraktionsschritt sind deshalb falsch niedrig (15). Die Extraktionsprozedur führt zu einer Vorverdünnung der Proben und dadurch zu einer verminderten Sensitivität des Assays. Zudem wird durch die Extraktion IGFBP nur unzureichend entfernt. Die im Extrakt verbleibenden IGFBPs können den Assay immer noch stören. Abgesehen von Serum oder Plasma ist die Säure-Alkohol-Extraktion in anderen Proben (z.B. Zellkulturmedien) völlig ineffektiv. Gerade hier ist die IGF-I-Bestimmung besonders schwierig, da diese Proben häufig einen hohen Überschuss an IGFBPs enthalten.

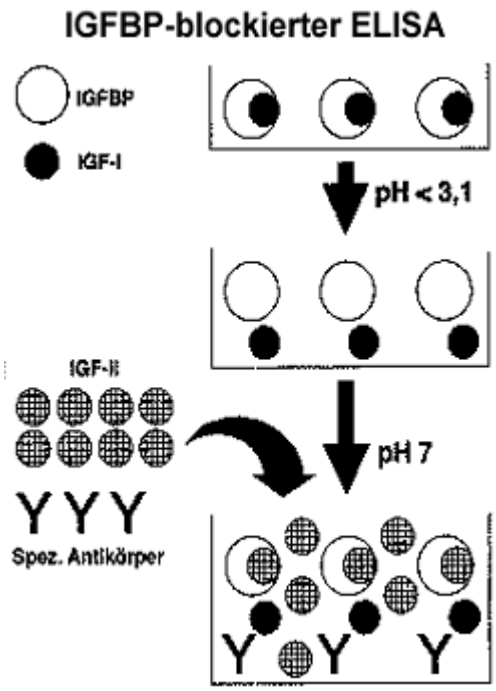
Klinische Bedeutung

Abgesehen von WH beeinflusst eine Anzahl von Faktoren den Serum-IGF-I-Spiegel. Erniedrigte Werte werden bei Malnutrition/Malabsorption, Hypothyreose, Lebererkrankungen, unbehandeltem Diabetes mellitus, chronisch-entzündlichen Erkrankungen (1,6), malignen Erkrankungen oder Polytrauma gefunden. Hohe Spiegel lassen sich bei Pubertas praecox oder Adipositas finden. Entscheidend für die korrekte Interpretation von IGF-I-Bestimmungen ist die Berücksichtigung der Altersabhängigkeit der IGF-I-Spiegel (altersabhängige Referenzwerte siehe Tab. 2 und Abb. 4-6).
Auf Grund seiner WH-Abhängigkeit sind Bestimmungen von Serum-IGF-I für die Diagnostik von Wachstumsstörungen von großem Nutzen, speziell im Hinblick auf WH-Mangel oder Akromegalie (6,16–19, 23, 24). Der wichtigste Vorteil der IGF-I-Bestimmung im Vergleich zur WH-Bestimmung ist seine stabile zirkadiane Konzentration, d.h. eine Einzelmessung ist ausreichend informativ. IGF-I -Bestimmungen sollten deshalb in der Labordiagnostik an erster Stelle stehen. Eindeutig normale Spiegel schließen eine Störung der WH-IGF-I-Achse aus. Niedrige Spiegel, d.h. Spiegel nahe oder unter der altersbezogenen 5. Perzentile machen weitere diagnostische Schritte notwendig. Subnormale IGF-I-Spiegel können ein Anzeichen für eine eingeschränkte WH-Sekretion sein, falls andere Ursachen für niedriges Serum-IGF-I wie Mangelernährung oder eine beeinträchtige Leberfunktion ausgeschlossen sind. Für die Unterscheidung von gesunden minderwüchsigen Kindern ohne WH-Mangel von Kindern mit "klassischem" WH-Mangel erwies sich die 0,1. Perzentile als günstige Trenngrenze. Dies gilt

speziell ab einem Alter von 8 Jahren. Es muss jedoch angemerkt werden, dass kleinwüchsige Kinder ohne WH-Mangel mit ihren Werten sehr wohl zwischen der 0,1. und 5. Perzentile liegen können (19). Im Gegensatz dazu ist die Akromegalie durch pathologisch erhöhte IGF-I-Spiegel gekennzeichnet, die offensichtlich den Schweregrad der Erkrankung besser reflektieren als WH-Messungen (17,18, 20).

3 TESTPRINZIP

Um IGF-I von den IGFBPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer (Probenpuffer SB) verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen pipettiert, der pH wird dabei neutralisiert. Nach Neutralisation der Probe besetzt das in hohem Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-I-Antikörpers mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion mit IGF-I nicht.



Der Mediagnost IGF-I ELISA E20 ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGF-I aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten IGF-I der zweite spezifische anti-IGF-I-Antikörper.
Dieser ist biotinyliert und ermöglicht die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Enzym-Konjugats.

Die folgende enzymatische Reaktion resultiert in einer Blaufärbung des Substrats, deren Intensität ist abhängig vom IGF-I Gehalt der Probe. Nach dem Stoppen der Reaktion wird die Farbintensität (dann gelb) durch die Messung der Absorption quantifiziert und mittels einer Kalibrationskurve in die IGF-I Konzentration umgerechnet.

Abb. 2. Prinzip des IGFBP-blockierten ELISA

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Für In-Vitro-Diagnostik. Zum Gebrauch durch Fachpersonal.

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Menschliches Serum
in folgenden Komponenten enthalten: **Kontrollen CTR1 & CTR2**
Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.

Komponenten
Im Folgenden werden alle Komponenten des Produktes aufgeführt, die Gefahrstoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen entsprechend der Europäischen Verordnung 1272/2008 enthalten:

Antikörper-Konjugat DET / Enzym-Konjugat EC
Die Puffer enthalten die nachfolgend aufgeführten gefährlichen Inhaltsstoffe, darauf basierend ergibt sich die folgende Kennzeichnung der beiden Gemische:

Gefahrenpiktogramme (CLP):

GHS07

Signalwort (CLP):	Achtung
Gefährliche Inhaltsstoffe:	2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (< 0,06 %) Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1) (< 0,015 %)
Gefahrenhinweise (CLP):	H317 - Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
Sicherheitshinweise (CLP):	P280 - Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz tragen. P272 – Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P261 - Einatmen von Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P302+P352 – Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P501 Inhalt/Behälter gemäß nationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen.

Waschpuffer WB / Probenpuffer SB
Die Puffer enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0,015 %).

EUH208	Enthält Reaktionsmasse aus 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

Stopplösung STP
Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure.

EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

4.1 Schutzausrüstung und Erste-Hilfe Maßnahmen

Nach Hautkontakt:	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen oder duschen. Bei Hautreaktion Arzt aufsuchen.
Nach Augenkontakt:	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei Augenreizung einen Augenarzt aufsuchen.
Nach Verschlucken:	Bei Unwohlsein Arzt anrufen.

Kontakt mit den Inhaltstoffen ist zu vermeiden. Detaillierte Informationen zur persönlichen Schutzausrüstung und zu Erste-Hilfe-Maßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zum IGF-I ELISA E20 zu entnehmen. Dieses kann elektronisch über die Website der Mediagnost GmbH unter www.mediagnost.de abgerufen werden oder wird auf Anfrage über contact@mediagnost.de zur Verfügung gestellt.

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

Serum und Heparin/EDTA Plasma ergeben vergleichbare Werte. Citrat-Plasma Proben sind aufgrund der relativ hohen Menge an Antikoagulantien verdünnt und die IGF-I Werte entsprechend reduziert.

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C max. 24 Stunden
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 3

Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 3 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die Proben.

5.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von **10 mg/mL, 100 mg/mL** bzw. **200 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:21** mit Probenpuffer **SB**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **200 µL** Probenpuffer **SB** gegeben (Verdünnungsfaktor **21**). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 20 µl pro Bestimmung innerhalb von max. 2 h im Assay eingesetzt.
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten **IGF-I-Werten**, geringer oder stärker in Probenpuffer **SB** verdünnt werden.
- Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. **1:10** in Probenpuffer **SB** verdünnt werden, um eine ausreichende Ansäuerung der Proben zu erreichen.
- Probenstabilität nach dem Verdünnen in Probenpuffer **SB**: max 2.h.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Kalibrationskurve.

MTP	**Mikrotiterplatte,** gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-hIGF-I-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	**(8x12) Vertiefungen**
CAL A-E	**Kalibratoren A – E,** lyophilisiert (rekombinantes humanes IGF-I), die Konzentrationen sind auf dem Chargenzertifikat angegeben.	**5 x 500 µL**
CTR1	**Kontrolle 1**, lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Chargenzertifikat angegeben.	**1 x 500 µL**
CTR2	**Kontrolle 2**, lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Chargenzertifikat angegeben.	**1 x 500 µL**
DET	**Antikörperkonjugat**, gebrauchsfertig, Ziegen-anti-hIGF-I-Antikörper biotinyliert.	**1 x 9 mL**
EC	**Enzym-Konjugat (POD)**, gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	**1 x 12 mL**
SB	**Probenpuffer**, gebrauchsfertig	**1 x 25 mL**
WB	**Waschpuffer**, 20fach konzentrierte Lösung	**1 x 50 mL**
S	**Substrat**, gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	**1 x 12 mL**
STP	**Stopplösung**, gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	**1 x 12 mL**
CF	**Abdeckfolie** für die **Mikrotiterplatte**	**2 x**
CERT	**Chargenzertifikat**	**1 x**

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) **(A. dest.),** 950 mL für die Verdünnung vom Waschpuffer **WB.**
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen
Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstitutierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit
Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **CTR1** und **CTR2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien
Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20-25°C gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern dürfen nicht vermischt werden.

Rekonstitution
Die Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **CTR1** und **CTR2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **SB** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung
Nach der Rekonstitution werden die Kontrollen **CTR1** und **CTR2** im gleichen Verhältnis (1:21) wie die Proben mit dem Probenpuffer **SB** verdünnt.
Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Testdurchführung
Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **A - E**, Kontrollen **CTR1** und **CTR2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **A - E**, Kontrollen **CTR1** und **CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Enzym-Konjugat **EC** sowie nachfolgend das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Inkubation
Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Schütteln
Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt kann die Schüttelfrequenz angepasst werden müssen. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.
Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusselndem Zellstoff.
Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwungvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
CAL A-E	**Kalibratoren**	in **500 µL** Probenpuffer **SB**	-
CTR1	**Kontrolle 1**	in **500 µL** Probenpuffer **SB**	**1:21** mit Probenpuffer **SB**
CTR2	**Kontrolle 2**	in **500 µL** Probenpuffer **SB**	**1:21** mit Probenpuffer **SB**
WB	**Waschpuffer Konz.**	-	**1:20** mit **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Proben + Kontrollen CTR1 und **CTR2** mit Probenpuffer **SB 1:21** verdünnen, **sofort mischen, max. 120 min inkubieren.** Davon **20 µL pro Bestimmung** einsetzen.			
Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien** auf **Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.			

Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
80 µL	Antikörper-Konjugat **DET**	in **alle benötigten Vertiefungen** pipettieren
20 µL	Probenpuffer **SB** (Leerwert)	A1/A2
20 µL	Kalibrator **A** (**2 ng/mL**)	B1/B2
20 µL	Kalibrator **B** (**5 ng/mL**)	C1/C2
20 µL	Kalibrator **C** (**15 ng/mL**)	D1/D2
20 µL	Kalibrator **D** (**30 ng/mL**)	E1/E2
20 µL	Kalibrator **E** (**50 ng/mL**)	F1/F2
20 µL	Kontrolle **CTR1** (1:21 verdünnt)	G1/G2
20 µL	Kontrolle **CTR2** (1:21 verdünnt)	H1/H2
20 µL	Probe **SPE** (1:21verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Proben-Inkubation: 1 h bei 20 - 25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB** **WB 1:20** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Enzym-Konjugat **EC**	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 30 Minuten bei 20 - 25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte **5x** mit je **300 µL** Waschpuffer **WB 1:20** / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substrat **S**	In jede Vertiefung
Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C		
100 µL	Stopplösung **STP**	In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Kalibrationskurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln. Die Kit-Kontrollen müssen innerhalb der zulässigen Bereiche, die auf dem QC-Zertifikat angegeben worden sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

9.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, **Kalibrator E** sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der **Kalibrator E** erzielen, liegen außerhalb der Kalibrationskurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Als Kalibratormaterial wurde der 1. Internationaler Standard für WHO NIBSC 02/254 verwendet. Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende hIGF-I-Konzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	2	5	15	30	50
nmol/L	0,26	0,66	1,96	3,92	6,54

1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).

2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratoren, Proben und Kontrollen wird der mittlere Leerwert abgezogen.

3) Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.

4) Die Berechnung der Kalibrationskurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.

5) Die **Multiplikation** des jeweiligen für die Proben und Kontrollen **CTR1** und **CTR2** berechneten IGF-I-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben und Kontrollen ergibt die **IGF-I-Konzentration in ng/mL** (oder **nmol/L**, je nach gewählter Einheit der Standards).

10.2 Beispiel für eine typische Kalibrationskurve

Die exemplarischen Daten und die Kalibrationskurve in der Abbildung 3 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Kalibrationskurve mitgeführt werden.

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0	2	5	15	30	50
OD (450-620 nm)	0,00	0,088	0,299	0,985	1,727	2,543

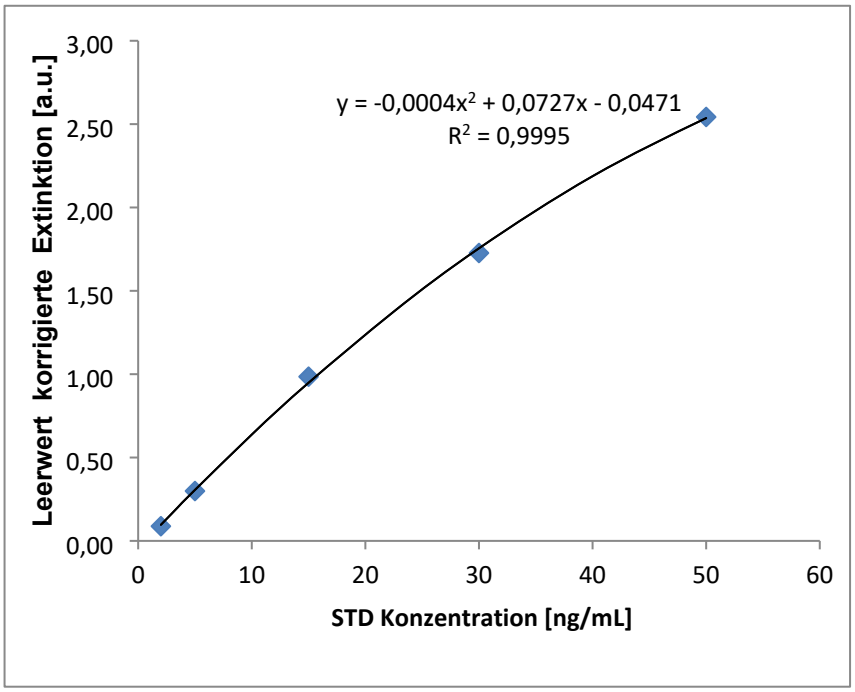


Abb. 3: Exemplarische Kalibrationskurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der hIGF-I-Konzentration

Probenverdünnung: 1:21

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,0165
Gemessene Extinktion der Probe: 0,2695

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung die hIGF-I-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 3 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGF-I-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0{,}253 = -0{,}0004x^2 + 0{,}0727x - 0{,}0471$$
$$4{,}57 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:21**) somit eine **IGF-I** -Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$4{,}57 \times 21 = 96 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis allein sollte nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese, weitere klinische Beobachtungen der testspezifischen Referenzwerte und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche ermittelt.
Es wird empfohlen die internationalen und nationalen Leitlinien zur Diagnostik des Wachstumshormonmangels bzw. der Akromegalie zu beachten.

11 EINSCHRÄNKUNGEN

IGF-I-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Erniedrigte Werte beweisen jedoch keinesfalls einen Wachstumshormonmangel, da eine Reihe anderer Faktoren die IGF-I-Konzentration ebenfalls beeinflussen und deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden müssen. IGF-I-Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), als Ergebnis chronischer Malnutrition, Malabsorption und Kachexie, bei eingeschränkter Leberfunktion, bei Hypothyreose und unbehandeltem Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei systemisch-entzündlichen Erkrankungen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein.
IGF-I-Spiegel sind erhöht bei vorzeitiger Pubertät. In klinischen Situationen, die mit Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Craniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale Werte auftreten. Während der späten Schwangerschaft sind die IGF-I-Werte mäßig erhöht.

Der Mediagnost IGF-I ELISA E20 basiert auf einer Kombination aus monoklonalem Fänger- und polyklonalen Detektionsantikörper. Grundsätzlich kann das Ergebnis von immunologischen Testsystemen durch z.B. heterophile Antikörper oder Rheumafaktoren beeinflusst werden. Über das Assay Design werden diese Einflüsse minimiert, können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

12 REFERENZWERTE

Die IGF-I-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen bis zu einem Alter von etwa 60 Jahren ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Referenzbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in der Tabelle 2 durch Perzentile angegeben. Diese Werte sind nur Richtwerte; für die diagnostische Auswertung von Patientendaten muss jedes Labor eigene Referenzwerte ermitteln.
Zwischen 8 und 19 Jahren sind die Werte für Jungen und Mädchen getrennt aufgeführt, da der Pubertätsgipfel üblicherweise bei Mädchen 2 Jahre früher auftritt. Graphische Darstellungen werden in Abbildung 4, 5 und 6 gezeigt. Ein Hauptproblem für die Interpretation von IGF-I-Werten ergibt sich aus der Tatsache, dass Minderwuchs oft auf eine Entwicklungsverzögerung zurückzuführen ist, seltener auf eine metabolische oder endokrine Erkrankung (konstitutionelle Entwicklungsverzögerung). Der starke Anstieg der IGF-I-Spiegel während der Pubertät führt deshalb gelegentlich zu falsch subnormalen Werten, wenn die gemessenen IGF-I-Konzentrationen des Patienten auf das chronologische und nicht auf das biologische Alter bezogen werden. Es empfiehlt sich, in einem solchen Fall das Pubertätsstadium in die Betrachtung mit einzubeziehen (Tabelle 1), um ein angemessenes Bild von der Situation zu erhalten.

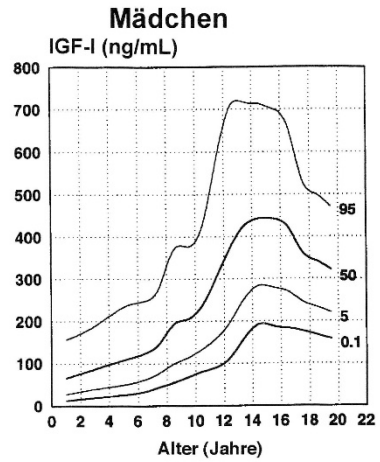


Abb. 4.: Altersabhängiger Referenzbereich der Serum-IGF-I Spiegel bei Mädchen.

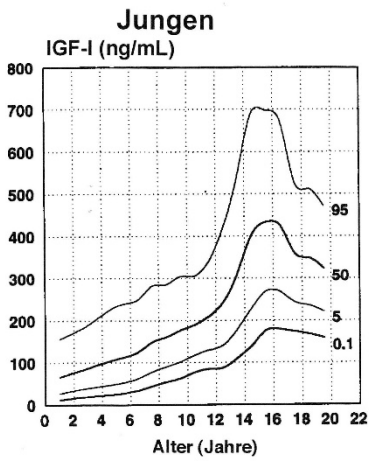


Abb. 5: Altersabhängiger Referenzbereich der Serum-IGF-I Spiegel bei Jungen.

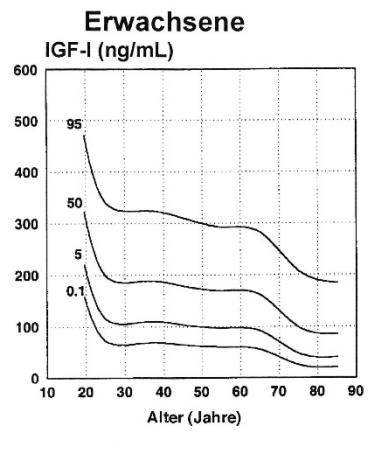


Abb. 6: Altersabhängiger Referenzbereich der Serum-IGF-I Spiegel bei Erwachsenen.

Tabelle 1 Referenzbereich der Serum-IGF-I-Spiegel angegeben in ng/mL in verschiedenen Pubertätsstadien nach Tanner. Da zwischen Mädchen und Jungen keine Unterschiede bestanden, wurden jeweils beide Geschlechter zusammengefasst. Lediglich Kinder und Jugendliche zwischen 7 und 17 Jahren wurden betrachtet

Pubertäts-stadium	Perzentile			
	0,1.	**5.**	**50.**	**95.**
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Tabelle 2 IGF-I Serumkonzentrationen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Alter. Zwischen dem 8. und 19. Lebensjahr wurden die Daten nach Geschlecht getrennt ausgewertet, weil bei den Mädchen der Anstieg der Serumkonzentrationen während der Pubertät meistens 2 Jahre früher erfolgt.

	Perzentile													
Altersgruppe	**0,1.**	1.	**5.**	10.	**20.**	30.	**40.**	50.	**60.**	70.	**80.**	90.	**95.**	99.
0-2 J.	**13**	20	**28**	34	**43**	50	**58**	66	**75**	87	**102**	128	**156**	220
2-4 J.	**20**	29	**40**	48	**59**	68	**77**	87	**98**	111	**129**	159	**189**	260
4-6 J.	**26**	36	**50**	59	**73**	85	**96**	108	**122**	138	**160**	196	**233**	320
6-7 J.	**34**	46	**62**	72	**87**	99	**111**	124	**138**	155	**176**	212	**248**	332
7-8 J.	**45**	60	**78**	90	**107**	121	**134**	148	**163**	181	**205**	243	**281**	364
8-9 J. Jungen	**54**	71	**90**	102	**119**	133	**146**	160	**175**	192	**214**	250	**284**	362
Mädchen	**55**	75	**99**	115	**137**	156	**174**	193	**214**	239	**271**	324	**376**	496
9-10 J. Jungen	**63**	82	**102**	115	**133**	148	**162**	176	**191**	209	**232**	269	**304**	379
Mädchen	**68**	89	**114**	130	**152**	170	**187**	205	**224**	247	**276**	323	**369**	469
10-11 J. Jungen	**77**	96	**117**	130	**148**	162	**176**	189	**203**	220	**241**	274	**305**	370
Mädchen	**81**	106	**134**	153	**178**	199	**219**	239	**261**	287	**321**	374	**426**	539
11-12 J. Jungen	**85**	106	**129**	144	**163**	179	**194**	209	**225**	244	**267**	304	**339**	413
Mädchen	**91**	123	**160**	185	**220**	248	**276**	305	**337**	374	**424**	503	**581**	758
12-13 J. Jungen	**88**	112	**141**	159	**184**	204	**223**	243	**264**	289	**321**	371	**419**	525
Mädchen	**116**	155	**201**	231	**274**	309	**342**	377	**415**	460	**519**	614	**707**	914
13-14 J. Jungen	**111**	143	**179**	203	**235**	261	**286**	311	**339**	371	**412**	477	**540**	677
Mädchen	**163**	207	**256**	287	**329**	364	**395**	428	**463**	504	**556**	637	**716**	884
14-15 J. Jungen	**140**	182	**229**	260	**303**	337	**370**	404	**441**	484	**539**	625	**691**	896
Mädchen	**193**	236	**284**	314	**353**	385	**414**	443	**474**	510	**556**	628	**713**	832
15-16 J. Jungen	**176**	221	**269**	299	**340**	372	**402**	433	**466**	504	**552**	626	**697**	849
Mädchen	**187**	231	**279**	309	**350**	382	**412**	442	**474**	512	**559**	632	**700**	845
16-17 J. Jungen	**178**	221	**267**	296	**335**	366	**395**	424	**455**	491	**537**	607	**673**	814
Mädchen	**183**	225	**270**	298	**336**	366	**394**	422	**452**	486	**530**	597	**660**	792
17-18 J. Jungen	**173**	207	**243**	265	**294**	317	**337**	358	**380**	405	**436**	484	**527**	618
Mädchen	**176**	210	**246**	268	**297**	320	**341**	362	**384**	409	**441**	488	**533**	624
18-19 J. Jungen	**167**	201	**235**	256	**285**	307	**327**	347	**368**	393	**423**	469	**512**	600
Mädchen	**167**	199	**233**	254	**281**	302	**322**	341	**362**	385	**414**	458	**499**	583
19-20 J.	**158**	189	**220**	240	**265**	285	**304**	322	**341**	363	**391**	433	**471**	550
20-30 J	**72**	92	**115**	130	**150**	167	**182**	198	**215**	235	**261**	302	**340**	425
30-40 J	**68**	87	**109**	123	**142**	158	**173**	188	**204**	223	**248**	287	**324**	404
40-50 J	**64**	82	**103**	116	**135**	150	**164**	178	**194**	212	**235**	272	**310**	385
50-60 J	**60**	77	**97**	110	**127**	142	**155**	169	**184**	201	**224**	260	**292**	369
60-70 J.	**55**	72	**91**	103	**120**	134	**147**	161	**176**	193	**215**	251	**282**	362
70-80 J.	**25**	35	**47**	55	**67**	78	**88**	98	**110**	124	**142**	173	**207**	276
>80 J.	**21**	30	**40**	47	**58**	67	**76**	85	**95**	108	**125**	153	**184**	245

Die Serumkonzentrationen sind in **ng/ml** angegeben.

Diese Referenzwerte wurden von Prof. Dr. W.H Blum durch einen Radioimmunoassay, der identisch mit dem Mediagnost IGF-R20 ist, erhoben. Somit können die alters- und geschlechtsspezifischen Referenzwerte, die in Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents (In: Ranke MB (ed): ISBN-3-335-00496-5) publiziert wurden, auf alle Mediagnost IGF-I-Tests angewendet werden. Üblicherweise wird eine Abweichung im Bereich von mehr als ± 2SD als pathologisch betrachtet und fordert weitere Untersuchungen in Bezug auf die klinischen Symptome.

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

13.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (Limit of Detection) wurde durch mehrfaches Messen des Leerwertes bestimmt. Die daraus ermittelte zweifache Standardabweichung des Leerwertes beträgt 0,09 ng/mL. In 19 unabhängigen Bestimmungen wurden Werte von 0,03 ng/mL bis 0,17 ng/mL gefunden.

13.2 Spezifität

Die Kreuzreaktivität mit IGF-II, Insulin und C-Peptid wurde getestet. Diese IGF-verwandten Proteine wurden dem Assay-Puffer in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, und die Lösung wurde als Probe ohne weitere Verdünnung im Assay eingesetzt. Die gemessene IGF-I Konzentration des Leerwertes ohne diese Proteine betrug 0,78 µg/L. Somit zeigt sich keine signifikante Kreuzreaktivität von IGF-II, Insulin oder C-Peptid (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Spezifität: Kreuzreaktivität des Testsystems mit unterschiedlichen IGF-I - ähnlichen Proteinen.

zugesetzt C-Peptide [µg/L]	gemessen IGF-I [µg/L]	zugesetzt Insulin [µg/L]	gemessen IGF-I [µg/L]	zugesetzt IGF-II [µg/L]	gemessen IGF-I [µg/L]
500	0,73	100	0,78	1250	0,77
100	0,78	10	0,77	750	0,73
10	0,77	1	0,76	250	0,77
0	0,78	0	0,78	0	0,78

13.3 Präzision

Intra-Assay Variabilität

Drei Proben wurden mehrfach in dem gleichen Assay gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt, der gemessene Variationskoeffizient (VK) beträgt 5,81 % im Durchschnitt.

Tabelle 4 Intra-Assay Variabilität

	Anzahl von Bestimmungen	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	18	144,8	9,63	6.65
Probe 2	18	140,79	7,15	5.08
Probe 3	18	138,02	7,86	5.69

Inter-Assay und Lot-to-Lot Variabilität

Serumproben, wurden in unabhängigen Tests gemessen. Beispielhafte Ergebnisse sind in der Tabelle 5 gezeigt. Chargen-übergreifend wurden in acht verschiedenen Chargen innerhalb eines Zeitraumes von vier Jahren in fünf Serumproben ein Variationskoeffizient von ∅ 8,57 % ermittelt (min/max: 6,76 – 10,46 %).

Tabelle 5 Inter-Assay Variabilität

	Anzahl von Bestimmungen	Mittelwert (ng/mL)	Standardabweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	8	81	5,34	6,56
Probe 2	16	192	12,35	6,43
Probe 3	17	498	27,52	5,53

13.4 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnungen von nativen Seren mit unterschiedlichen IGF-I Konzentration (Probe 1-3) getestet. Die Proben wurden seriell in Probenpuffer verdünnt und der IGF-I Gehalt in jeder Verdünnung ermittelt. Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass die unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnete IGF-I-Konzentration in der Probe unabhängig von der Verdünnung ist. Die Variabilität über die 4 bzw. 5 Verdünnungsstufen beträgt für die Proben mit einer IGF-I-Konzentration von 183, 322 und 397 ng/mL 3,38, 3,11 und 2,14 %.

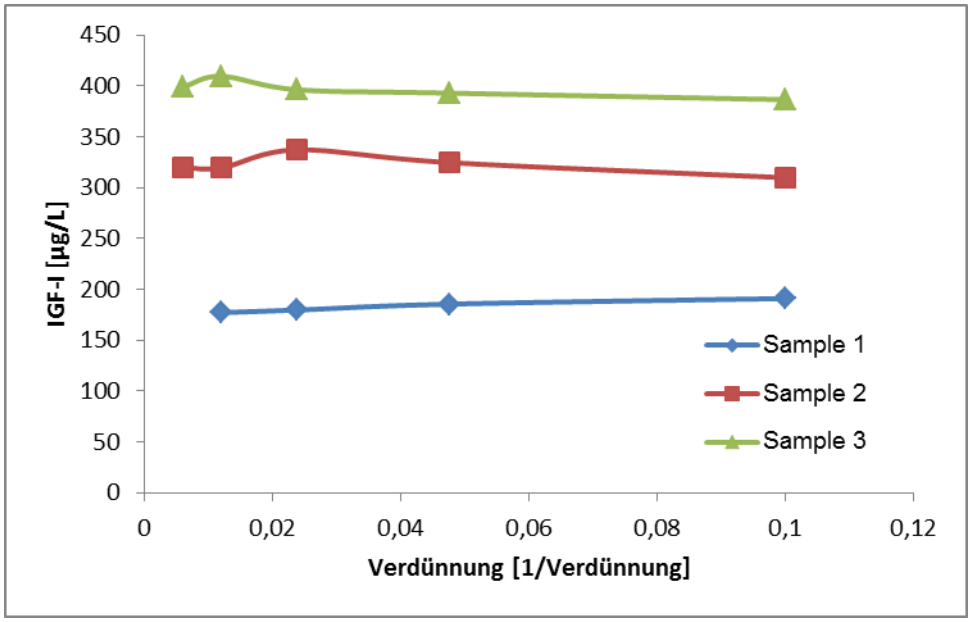


Abb. 7 Linearität, neu berechnet IGF-I-Konzentrationen von differentiell verdünnten Proben. Die Proben müssen mindestens 1:10 verdünnt werden, die empfohlene Verdünnung ist 1:21.

13.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Rekombinantes IGF-I wurde Seren in unterschiedlichen Mengen zugesetzt. Der IGF-I-Gehalt, der auf diese Weise angereicherten Proben, wurde gemessen und die Wiederfindung im Vergleich zu angereichertem Puffer berechnet. Ergebnisse sind in der Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6 Wiederfindung von rekombinanten IGF-I in Humanserum.

IGF-I [µg/L]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Probe	138	172	133	180
+ IGF-I 200	287	372	--	--
+ IGF-I 400	--	--	539	591
% Wiederfindung	**85**	**100**	**101**	**102**

13.6 Rückführbarkeit / Assay Kalibration

Die Quantifizierung des IGF-I in der Probe erfolgt durch den Einsatz eines Kalibrators, der rekombinant exprimiertes IGF-I in einer Reinheit von > 98% (SDS-PAGE, Silberfärbung) enthält. Die Rückführbarkeit der Konzentration des rekombinanten Kalibrationsmaterials auf das internationale Referenzmaterial (WHO 02/254) wurde durch eine unabhängige, internationale Studie gezeigt. Die Ergebnisse wurden von Burns C et al. in der Zeitschrift Growth Horm IGF Res. 2009 Oct;19(5):457-62. Epub 2009 Mar 20 publiziert. Der Mediagnost IGF-I ELISA E20 ist in der Studie der mit 14c bezeichnete Test.

Das Referenzmaterial enthält **8.5 µg IGF-I pro Ampulle**. Dieser Messwert wurde über eine Aminosäureanalyse und HPLC ermittelt. Der Mediagnost E20 Immunoassay (Assay No. 14c) bestimmt eine IGF-I-Konzentration von 11.55 µg pro Ampulle. Im Vergleich dazu liegt die gemessene IGF-I-Menge im Mittel aller Immunoassays bei **11.61 µg pro Ampulle**. Somit beträgt der Faktor, um Mediagnost Messergebnisse auf den WHO 02/254 Standard zu normieren, **0,735**.

13.7 Interferenz

Der Einfluss von Bilirubin, Hämoglobin und Triglyceriden auf die Messung von IGF-I wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen dieser Stoffe zu humanen Serumproben getestet. Um den Einfluss der jeweiligen Lösungsmittel auszuschließen, wurde zum Vergleich die gleiche Menge / Volumen Puffer ohne Zusatz zu den Seren dazugegeben. Tabelle 7 zeigt, dass weder Bilirubin, Hämoglobin noch Triglycerid Einfluss auf die Messung von IGF-I in menschlichem Serum ausüben.

Tabelle 7 Testung der Interferenz physiologischer Substanzen für die IGF-I-Messung. Drei Humanserumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Triglyceriden, Bilirubin oder Hämoglobin versetzt und die Auswirkung auf die gemessene IGF-I-Konzentration im Vergleich zum nativen Serum bestimmt.
Die höchsten Konzentrationen und ihre Auswirkungen auf die Wiederfindung von IGF-I [%] sind hier gezeigt.

	Triglyceride 100 mg/mL	**Bilirubin 200 µg/mL**	**Hämoglobin 10 mg/ml**
Serum 1	93	90	97
Serum 2	100	101	110
Serum 3	120	120	104

Der Einfluss von Bindungsproteinen auf IGF-I-Messung wurde exemplarisch mit IGFBP-3 erläutert. Verschiedene Mengen an IGF-I und 3 bzw. 6 mg/L IGFBP-3 wurden in Puffer (pH 2) und in PSB (pH 7,4) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der IGF-I-Gehalt dieser Proben im E20 bestimmt. IGFBP-3 stört bis 6 mg/L im Probenpuffer **SB** die IGF-I-Messung nicht. Ohne eine Ansäuerung der Probe kommt es jedoch zu einer starken Abweichung vom Zielwert (Tabelle 8).

Tabelle 8 Interferenz von IGFBP-3 auf die IGF-I Messung

IGFBP-3	**Probenpuffer SB + IGF-I [µg/L]**		
[mg/L]	50	100	300
0	46	116	358
3	47	116	384
6	52	123	355
IGFBP-3	**PBS + IGF-I [µg/L]**		
[mg/L]	50	100	300
0	34	90	349
3	7	12	152
6	7	10	48

14 VERGLEICHSSTUDIEN

Mediagnost E20 IGF-I wurde mit dem Mediagnost IGF-R20 verglichen. 196 Serumproben wurden in beiden Tests gemessen. Die Korrelation (Abbildung 8) mit den beiden Tests war sehr gut. Die Abweichung liegt im Bereich der Inter-Assay-Variabilität und ist deshalb vernachlässigbar. Des Weiteren wurden Vergleiche mit kommerziell verfügbaren IGF-I Tests durchgeführt. Diese zeigen eine gute Korrelation der Messergebnisse des Mediagnost IGF-I ELISAs E20 (R^2 >0,9).

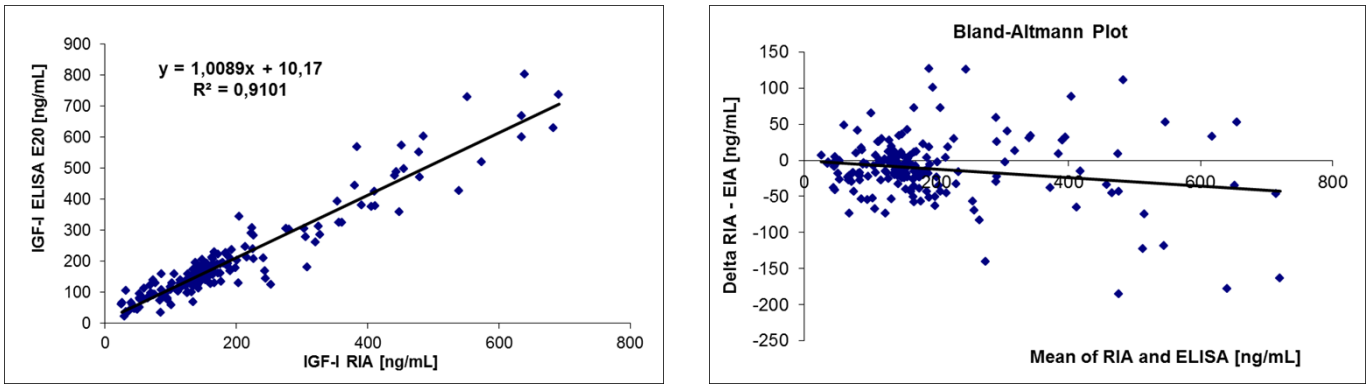


Abb. 8: Testvergleich Mediagnost RIA R20 und Mediagnost ELISA E20.

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

IGF-I findet sich in sehr niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten ebenso wie in Zellkulturmedien vieler Zelllinien. Die Bestimmung in diesen Proben ist besonders schwierig. Die Ursache hierfür sind IGFBPs, die oft in größeren Mengen vorhanden sind. Der IGFBP-blockierte ELISA erlaubt die einfache, korrekte und sensitive IGF-I-Bestimmung in zahlreichen Proben mit minimalem Zeitaufwand.

15.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, Plasma, Zellkulturüberstand verschiedener humaner **Zelllinien, Urin, Liquor.**

Die IGF-I-Konzentration in diesen Probenmatrices können stark schwanken, daher muss die optimale Verdünnung im Einzelfall vom Anwender ausgetestet werden. Rekombinantes IGF-I konnte erfolgreich in **1:2 in Probenpuffer SB verdünntem Urin, Zerebrospinal Flüssigkeit** und **in Zellkulturmedien** gemessen werden (bei Berücksichtigung der Spezies-Kreuzreaktivitäten (s.u.)).

Auch in Zelllysaten kann IGF-I mittels dieses Testsystems nachgewiesen werden. Ein möglicher Lysispuffer könnte aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt sein: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 30 mM Sodium Pyrophosphate/ 50 mM Sodium Fluoride/ 100 µM Sodium Orthovanadate/ 1 mM PMSF/ 1% Triton X-100. Entscheidend ist die IGF-I-Synthese, ist diese zu niedrig (< 0,09 ng/mL bzw. 0,9 ng/mL bei 1:10 Verdünnung) so kann der Test kein IGF-I detektieren.

Exprimiert die Zelllinie keine IGF-Bindungsproteine, so kann das Zelllysat direkt als Probe eingesetzt werden. Jedoch sollte die Messung für jede Zelllinie und jeden Zelllysispuffer durch den Einsatz von rekombinantem IGF-I in Wiederfindungsexperimenten validiert werden.

Ein vergleichbares Verfahren zur Messung von IGF-II wurde von Mohlin S, Hamidian A, Påhlman in NEOPLASIA, 2013, Volume 15 No 3 veröffentlicht.

15.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet.

Damit wurde nachgewiesen, dass der Test als heterologer Assay für IGF-I-Messung in Serumproben von Primaten, Rindern, Schweinen, Schafen, Pferden, Eseln, Ziegen, Hunden, Katzen, Kaninchen und Meerschweinchen eingesetzt werden kann. Artspezifische Kalibrierung muss durch den Benutzer durchgeführt werden.

Für IGF-I-Bestimmung in Seren von Ratten, Mäusen sowie Hühnern ist der Test **nicht** geeignet.

Um exakte artspezifische IGF-I-Konzentrationen zu ermitteln, muss das Testsystem speziesspezifisch kalibriert werden: Verwendung von z.B. bovinem IGF-I in bekannter Konzentration.

ENGLISH - Instructions for use

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH - Instructions for use 24
1 INTENTED USE 24
2 INTRODUCTION 24
3 PRINCIPLE 26
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 27
5 SAMPLES 28
6 MATERIALS 29
7 TECHNICAL NOTES 30
8 ASSAY PROCEDURE 31
9 QUALITY CONTROL 32
10 EVALUATION OF RESULTS 32
11 LIMITATIONS OF PROCEDURE 34
12 REFERENCE VALUES 34
13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 36
14 ASSAY COMPARISON 39
15 SCIENTIFIC APPLICATION 40
16 LITERATUR / REFERENCES 41
17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION 43
18 ASSAY PROCEDURE 44

ENGLISH - Instructions for use

IGF-I ELISA E20	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/20
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	specific, monoclonal antibody and high-affinity polyclonal antiserum
Cross reactivity with IGF-II, Insulin, C-Peptide	< 0.1%
Buffers	Ready for use and 20fold concentrate
Calibrators	5 single Calibrators: 2 -50 ng/mL, recombinant human IGF-I
Reference material	International Standard WHO/NIBSC 02/254
Assay Range	0.09 – 1050 ng/mL
Controls	2 Controls, freeze-dried
Samples	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:21
Analytical sensitivity	ø 0.09 µg/L
Intra- / Interassay Variance	ø < 10 %
Reference values	Blum W.F., Schweizer R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB (ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199.

1 INTENTED USE

The ELISA E20 is intended to be used for the measurement of human IGF-I in serum and plasma samples. In combination with growth retardation and other clinical symptoms the results of this test system can be used as supplementary data to assess disturbances of the growth hormone axis.

2 INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGF) I and II play a pivotal role in regulating the proliferation, differentiation and specific functions of many cell types (1-3). IGF-I is identical with Somatomedin C (Sm-C) (4) and has a molecular weight of 7649 Dalton (5). Its major regulators are growth hormone (GH) and nutrition (6), although its production in specific tissues is affected by a multitude of tropic hormones and other peptide growth factors. In contrast to many other peptide hormones, IGFs are avidly bound to specific binding proteins (IGFBP). The seven classes of IGFBPs which are known at present (7,8,22) either bind IGF-I and IGF-II with similar affinities or show a preference for IGF-II (9,10).
A major problem of IGF-I measurement results from the interference of IGFBPs in the assay. Direct determinations in untreated serum samples (11) give false values because of the extremely slow dissociation of the IGF-I/IGFBP-3 complexes during the assay incubation. Depending on the ratio IGF-I to IGFBP the following errors may occur (see also Figure 1):

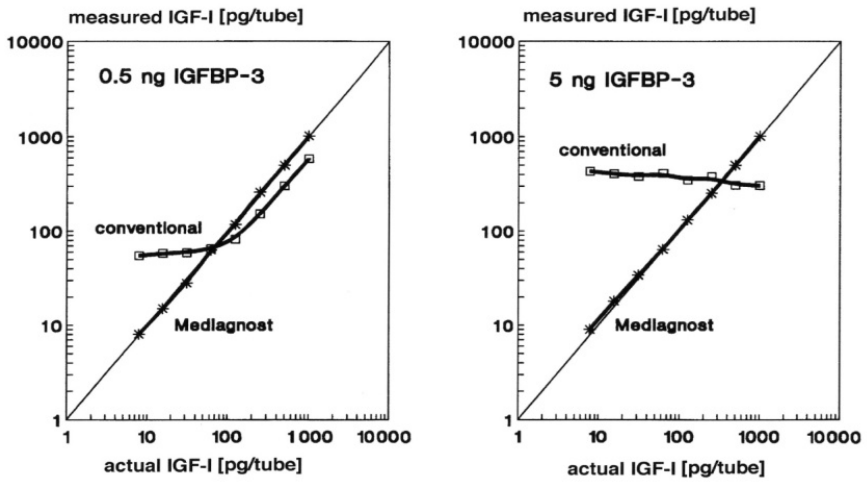


Fig. 1 Interference of IGFBP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (□) and by the IGFBP-blocked RIA (*)

Therefore, various techniques were applied to physically separate IGF-I from its binding proteins before measurement, including (a) size exclusion chromatography under acidic conditions, (b) solid-phase extraction and (c) acid-ethanol extraction (2,12,13). These techniques, however, are either inconvenient or time-consuming or give incomplete and not-reproducible recoveries. The most widely used method is the acid-ethanol extraction (13,14) with a recovery of only 70-80 % of IGFBP-bound IGF-I as a result of co-precipitation. The absolute results of such an extraction are therefore false low (15). The extraction removes the IGFBPs only insufficiently and leads to reduction in sensitivity of the assay due to pre-dilution of the samples by the extraction procedure. Furthermore, the remaining IGFBP may still interfere in the assay. In addition, the acid-ethanol extraction is ineffective in specimens other than serum or plasma (e.g. cell culture media), in which determination of IGF-I is already difficult enough due to the fact that IGFBPs are frequently present at large excess.
To avoid these difficulties, an uncomplicated assay was developed, in which special sample preparation is not required before measurement.

Clinical Significance

There are apart from GH, a number of variables that influence serum IGF-I. Decreased levels are found in states of malnutrition/ malabsorption, hypothyroidism, liver disease, untreated diabetes mellitus, chronic inflammatory disease (1,6), malignant disease or polytrauma. High levels, on the other hand, are likely to be present in precocious puberty or obesity. Crucially important to the correct interpretation of IGF-I measurement is the relationship between age and IGF-I levels (see Table 2 and Fig.: 4-6).
Due to its GH-dependence, determination of serum IGF-I was shown to be a useful tool in diagnosis of growth disorders, especially with regard to GH deficiency (GHD) or acromegaly (6,16-19,23,24). The major advantage of IGF–I determination compared to GH determination is its stable circadian concentration; therefore a single measurement is sufficient. Hence IGF-I determination should be the first in a series of laboratory test. Clearly normal levels would then rule out disturbances of the GH-IGF-I-axis. Low levels, i.e. close to or below the age-related 5th percentile would indicate the necessity of further diagnostic efforts. Subnormal levels of IGF-I would be evidence for reduced GH secretion, if other causes of low serum IGF-I (e.g. malnutrition or impaired liver function) can be ruled out. For differentiation of healthy short children without GH deficiency and children with "classical" GH deficiency, the 0.1st percentile proved to be an appropriate cut-off point, especially after the age of eight. However, IGF-I levels of short children not suffering from GHD may nevertheless lay between the 0.1st and 5th percentile (19). In contrast, acromegaly is characterized by pathologically elevated IGF-I levels, which apparently reflect the severity of the disease better than GH-levels (17,18,20).

3 PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for IGF-I E20 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

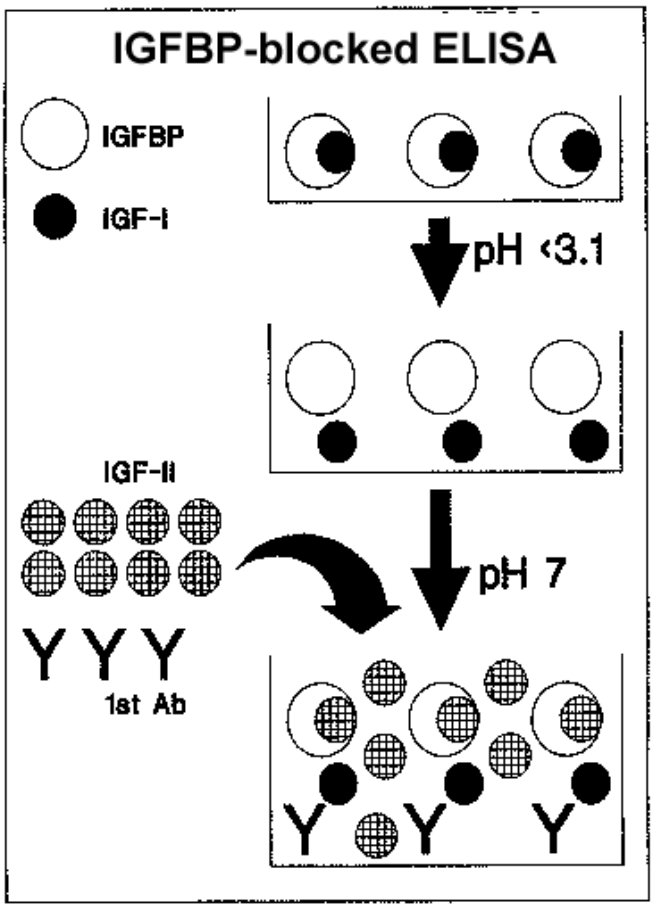


Fig. 2 Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

In order to dissociate IGF-I from the IGFBPs, the samples must be diluted in an acidic buffer (**Sample Buffer SB)** (Figure 2). The diluted samples are then pipetted into the wells, by this the pH-value will be neutralized. After neutralization of the samples, the excess IGF-II occupies the IGF-binding sites of the binding proteins, thus allowing the measurement of resulting free IGF-I. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized. Due to the extremely low cross-reactivity of the IGF-I antibody with IGF-II, the excess of IGF-II does not disturb the interaction with IGF-I.

The test runs like a conventional ELISA using a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro diagnostics and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore, all components and patient´s specimens should be treated as potentially infectious.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum

Following components contain human serum: **Controls CTR1 and CTR2**

Source human serum for the Controls provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient´s specimens should be treated as potentially infectious.

Components

All components of the product that contain hazardous substances in declarable concentrations in accordance with European Regulation 1272/2008 are listed below:

Antibody Conjugate DET / Enzyme Conjugate EC

The buffers contain the hazardous ingredients listed below, based on this the following labeling of the two mixtures results:

Hazard pictograms (CLP):

GHS07

Signal word (CLP):	Warning
Hazardous components:	2-methylisothiazol-3(2H)-one (< 0,06 %) reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (< 0,015 %)
Hazard statements (CLP):	H317 - May cause an allergic skin reaction.
Safety instructions (CLP):	P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearingprotection. P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace. P261 - Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray. P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of Water. P501 - Dispose of contents/container in accordance with national disposal regulations.

Washing Buffer WB / Sample Buffer SB

The buffers contain a mixture of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0.015 %) as a preservative.

EUH208	Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). May produce an allergic reaction.
EUH210	Safety data sheet available on request.

Stop Solution STP

The stop solution contains 0.2 M sulphuric acid.

EUH210	Safety data sheet available on request.

4.1 Protective equipment and first aid measures

After contact with skin:	Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower. In case of skin reactions, consult a physician.
After contact with eyes:	Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. In case of eye irritation consult an ophthalmologist.
After ingestion:	Call a doctor if you feel unwell.

Avoid contact with the ingredients. Detailed information on personal protective equipment and first aid measures can be found in the safety data sheet for IGF-I ELISA E20. This can be accessed electronically via the Mediagnost GmbH website at www.mediagnost.de or will be made available on request via contact@mediagnost.de.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma
Serum and Heparin/EDTA Plasma yield comparable values. The IGF-I levels are reduced in citrate plasma samples, because of the relatively high amount of anticoagulant.

5.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: max. 24 hours
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized. 3 Freezing-Thawing showed no effect on samples.

5.5 Interference

Triglyceride, bilirubin and hemoglobin in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL and 200 µg/mL or 1 mg/mL. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:21** with Sample Buffer **SB**
- Pipette **200 µL Sample Buffer SB** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:21). After mixing use 2 x 20 µL of this dilution in the assay.
- Attention: serum and plasma samples must be diluted at least 1:10 in **Sample Buffer SB** in order to achieve sufficient acidification of the samples.
- Depending on the expected IGF-I values the samples can be diluted higher in **Sample Buffer SB.**
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 2 hours at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the Kalibrator curve.

MTP	**Microtiter plate,** ready for use, coated with mouse-anti-hIGF-I-antibody. Wells are separately breakable.	**(8x12) wells**
CAL A-E	**Calibrators A – E**, lyophilized, (recombinant human hIGF-I), concentrations are given on vial labels and on lot certificate.	**5 x 500 µL**
CTR1	**Control Serum 1,** lyophilised, (human serum), concentration is given on lot certificate.	**1 x 500 µL**
CTR2	**Control Serum 2,** lyophilised, (human serum), concentration is given on lot certificate.	**1 x 500 µL**
DET	**Antibody Conjugate,** ready for use, contains goat biotinylated anti-hIGF-I antibody**.**	**1 x 9 mL**
EC	**Enzyme Conjugate,** ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	**1 x 12 mL**
SB	**Sample Buffer,** ready for use.	**1 x 25 mL**
WB	**Washing Buffer,** 20-fold concentrated solution	**1 x 50 mL**
S	**Substrate,** ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	**1 x 12 mL**
STP	**Stop Solution,** ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	**1 x 12 mL**
CF	**Cover Foil,** for covering the **microtiter plate.**	**2 x**
CERT	**Lot Certificate**	**1 x**

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (A. dest.), 950 mL.**
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥590 nm

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at –20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components:** Calibrators **A-E** and Controls **CTR1** and **CTR2** must be stored at –20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WB** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Controls **CTR1 and CTR2** are reconstituted with the Sample Buffer **SB**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Controls **CTR1** and **CTR2** with the Sample Buffer **SB** in the same ratio (1:21) as the sample.
The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1 and CTR2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **DET** and the Enzyme Conjugate **EC** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**.
All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1** and **CTR2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive–storage and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a microtiter plate shaker. We recommend 350 rpm. Depending on the design of the shaker, the shaking frequency should be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

Proper washing is of basic **importance** for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WB** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

When using an **automatic microtiter** plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamical swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	**Calibrators**	in **500 µL** Sample Buffer **SB**	-
CTR1	**Control 1**	in **500 µL** Sample Buffer **SB**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
CTR2	**Control 2**	in **500 µL** Sample Buffer **SB**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
WB	**Washing Buffer conc.**		**1:20** with **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Samples + Controls CTR1 and CTR2: dilute 1:21 in Sample Buffer SB, mix immediately, incubate max. 2h. Use 20 µl for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature **(20-25°C)**.			

Assay procedure in double determination		
Pipette	**Reagents**	**Position**
80 µL	Antibody Conjugate **DET**	in **all** wells used
20 µL	Sample Buffer **SB** (Blank)	A1/A2
20 µL	Calibrator **A** (**2 ng/mL**)	B1/B2
20 µL	Calibrator **B** (**5 ng/mL**)	C1/C2
20 µL	Calibrator **C** (**15 ng/mL**)	D1/D2
20 µL	Calibrator **D** (**30 ng/mL**)	E1/E2
20 µL	Calibrator **E** (**50 ng/mL**)	F1/F2
20 µL	Control **CTR1** (1:21 diluted)	G1/G2
20 µL	Control **CTR2** (1:21 diluted)	H1/H2
20 µL	Sample **SPE** (1:21 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the cover foil.		
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** **/well**	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate **EC**	In each well
Cover the wells with the cover foil.		
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20** **/ well**	In each well
100 µL	Substrate **S**	In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stop Solution **STP**	In each well
Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

9 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws. All Calibrators and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

9.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of Calibrator E should be above 1.00.
Samples, which yield higher absorbance values than **Calibrator E**, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 2 by percentiles. Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 4, 5 and 6. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 1) to get a more complete picture of this situation.

10.1 Establishing of the Calibrator curve

The International Standard for hIGF-I, WHO NIBSC Code 02/254 was used as calibrator material and the following IGF-I concentrations are used.

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	2	5	15	30	50
nmol/L	0.26	0.66	1.96	3.92	6.54

1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all samples, controls and calibrators.
3) Plot the Calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the Calibrators on the y-axis.
4) Recommendation: Calculation of the Calibrator curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit** or **non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
5) The IGF-I concentration in ng/mL of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor.**

10.2 Example of a typical Calibrator curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	2	5	15	30	50
$OD_{(450\text{-}620\ nm)}$	0.00	0.088	0.299	0.985	1.727	2.543

The exemplary shown Calibrator curve in Figure 3 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

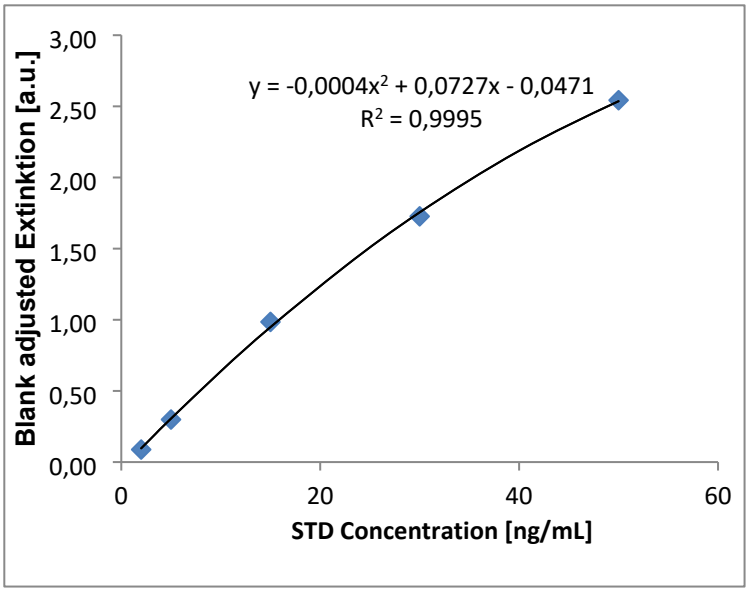


Fig. 3 Examplary calibration curve

10.3 Exemplary calculation of IGF-I concentrations

Sample dilution: 1:21

Measured extinction of the blank	0.0165
Measured extinction of your sample	0.2695

Your measurement program will calculate the IGF-I concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit.

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGF-I concentration in the sample:

$$0.253 = -0.0004x^2 + 0.0727x - 0.0471$$
$$4.57 = x$$

If the dilution factor (**1:21**) is taken into account the **IGF-I** concentration of the undiluted sample is

$$4.57\ \text{ng/mL} \times 21 = 96\ \text{ng/mL}$$

10.4 Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory. Please consider the international and national guidelines for diagnosis and treatment of growth hormone deficiency / acromegaly.

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE

IGF-I levels depend to a great degree on GH secretion. Diminished IGF-I values, however, do not prove GH deficiency, because a number of other factors can influence the plasma concentration of IGF-I and must therefore be taken into account in order to make a correct interpretation. IGF-I levels decrease during fasting (more than 1 day), as a result of malnutrition, malabsorption, cachexia, impaired hepatic function, or in hypothyroidism and untreated diabetes mellitus. They may also be low in chronic inflammatory disease and malignancies. IGF-I levels are high in states of accelerated sexual development. In clinical situations with hyperprolactinemia or in patients with craniopharyngioma, normal levels may be observed despite GH deficiency. In late pregnancy, IGF-I levels are moderately elevated.

The Mediagnost IGF-I ELISA is based on mono- and polyclonal antibodies. Generally the result of any immunological test system can be influenced by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatic factors. The assay design reduces these potential influences to a minimum but they cannot be excluded in any case.

12 REFERENCE VALUES

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 2 by percentiles. These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own reference of values for the diagnostic evaluation of patient results.
Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 4, 5 and 6. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 1) get a more complete picture of this situation.

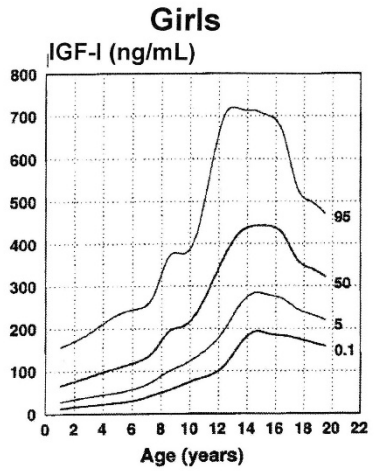


Fig. 4.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in girls.

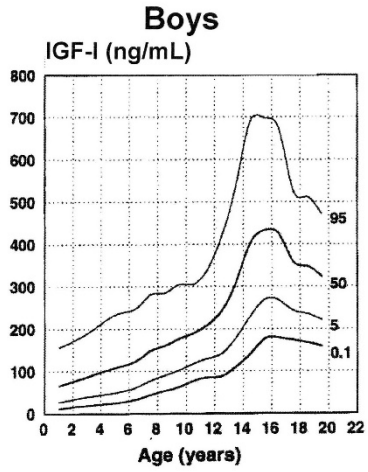


Fig. 5.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in boys.

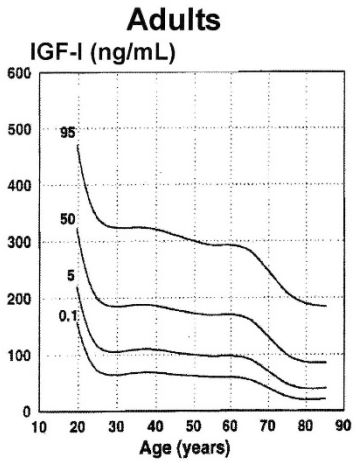


Fig. 6.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in adults.

Table 1 Normal range of serum IGF-I levels given in ng/mL at different pubertal stages according to Tanner. Because no significant difference between boys and girls is observed, both sexes are combined. Only children and adolescents between 7 and 17 years of age are included.

Pubertal Stage	Percentile			
	0.1th	5th	50th	95th
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Table 2 Serum levels of IGF-I in healthy subjects at various ages. Individuals between 8 and 19 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys.

	Percentile													
Age	**0.1**	1	**5**	10	**20**	30	**40**	50	**60**	70	**80**	90	**95**	99
0-2 y.	**13**	20	**28**	34	**43**	50	**58**	66	**75**	87	**102**	128	**156**	220
2-4 y.	**20**	29	**40**	48	**59**	68	**77**	87	**98**	111	**129**	159	**189**	260
4-6 y.	**26**	36	**50**	59	**73**	85	**96**	108	**122**	138	**160**	196	**233**	320
6-7 y.	**34**	46	**62**	72	**87**	99	**111**	124	**138**	155	**176**	212	**248**	332
7-8 y.	**45**	60	**78**	90	**107**	121	**134**	148	**163**	181	**205**	243	**281**	364
8-9 y. boys	**54**	71	**90**	102	**119**	133	**146**	160	**175**	192	**214**	250	**284**	362
girls	**55**	75	**99**	115	**137**	156	**174**	193	**214**	239	**271**	324	**376**	496
9-10 y. boys	**63**	82	**102**	115	**133**	148	**162**	176	**191**	209	**232**	269	**304**	379
girls	**68**	89	**114**	130	**152**	170	**187**	205	**224**	247	**276**	323	**369**	469
10-11 y. boys	**77**	96	**117**	130	**148**	162	**176**	189	**203**	220	**241**	274	**305**	370
girls	**81**	106	**134**	153	**178**	199	**219**	239	**261**	287	**321**	374	**426**	539
11-12 y. boys	**85**	106	**129**	144	**163**	179	**194**	209	**225**	244	**267**	304	**339**	413
girls	**91**	123	**160**	185	**220**	248	**276**	305	**337**	374	**424**	503	**581**	758
12-13 y. boys	**88**	112	**141**	159	**184**	204	**223**	243	**264**	289	**321**	371	**419**	525
girls	**116**	155	**201**	231	**274**	309	**342**	377	**415**	460	**519**	614	**707**	914
13-14 y. boys	**111**	143	**179**	203	**235**	261	**286**	311	**339**	371	**412**	477	**540**	677
girls	**163**	207	**256**	287	**329**	364	**395**	428	**463**	504	**556**	637	**716**	884
14-15 y. boys	**140**	182	**229**	260	**303**	337	**370**	404	**441**	484	**539**	625	**691**	896
girls	**193**	236	**284**	314	**353**	385	**414**	443	**474**	510	**556**	628	**713**	832
15-16 y. boys	**176**	221	**269**	299	**340**	372	**402**	433	**466**	504	**552**	626	**697**	849
girls	**187**	231	**279**	309	**350**	382	**412**	442	**474**	512	**559**	632	**700**	845
16-17 y. boys	**178**	221	**267**	296	**335**	366	**395**	424	**455**	491	**537**	607	**673**	814
girls	**183**	225	**270**	298	**336**	366	**394**	422	**452**	486	**530**	597	**660**	792
17-18 y. boys	**173**	207	**243**	265	**294**	317	**337**	358	**380**	405	**436**	484	**527**	618
girls	**176**	210	**246**	268	**297**	320	**341**	362	**384**	409	**441**	488	**533**	624
18-19 y. boys	**167**	201	**235**	256	**285**	307	**327**	347	**368**	393	**423**	469	**512**	600
girls	**167**	199	**233**	254	**281**	302	**322**	341	**362**	385	**414**	458	**499**	583
19-20 y.	**158**	189	**220**	240	**265**	285	**304**	322	**341**	363	**391**	433	**471**	550
20-30 y.	**72**	92	**115**	130	**150**	167	**182**	198	**215**	235	**261**	302	**340**	425
30-40 y.	**68**	87	**109**	123	**142**	158	**173**	188	**204**	223	**248**	287	**324**	404
40-50 y.	**64**	82	**103**	116	**135**	150	**164**	178	**194**	212	**235**	272	**310**	385
50-60 y.	**60**	77	**97**	110	**127**	142	**155**	169	**184**	201	**224**	260	**292**	369
60-70 y.	**55**	72	**91**	103	**120**	134	**147**	161	**176**	193	**215**	251	**282**	362
70-80 y.	**25**	35	**47**	55	**67**	78	**88**	98	**110**	124	**142**	173	**207**	276
>80 y.	**21**	30	**40**	47	**58**	67	**76**	85	**95**	108	**125**	153	**184**	245

Serum concentrations are given in ng/ml.

Reference values have been evaluated by Prof Blum by a radioimmunoassay identical to Mediagnost IGF-R20. Thus, the age and sex specific reference values published in Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents (Edited by Prof Ranke. ISBN-3-335-00496-5) can be applied to all Mediagnost IGF-I assays. Generally, a standard deviation score of +/- 2 SDS is acknowledged as pathological and should initiate further investigations regarding clinical symptoms.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank + 2SD. The analytical sensitivity of the Mediagnost E20 is 0.091 ng/mL as mean, in 19 independent determinations values from 0.03 ng/mL to 0.2 ng/mL were found.

13.2 Specificity

The measurements of E20 cross reactivity with IGF-II, Insulin and C-Peptide. These IGF-related proteins were added to assay buffer in the indicated concentration and the solution was applied as sample without any further dilution. The concentration measured within the blank without any protein was 0.78 µg/L. Thus, neither IGF-II nor Insulin or C-Peptide are measured by the Mediagnost E20 ELISA (see table 3).

Table 3 Specificity. Cross reactivity of the test system with different IGF-I related proteins.

added C-Peptide [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]	added Insulin [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]	added IGF-II [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]
500	0.73	100	0.78	1250	0.77
100	0.78	10	0.77	750	0.73
10	0.77	1	0.76	250	0.77
0	0.78	0	0.78	0	0.78

13.3 Precision

Intra-Assay Variance

Three samples have been measured severalfold in the same assay. The results are shown in Table 4. The measured coefficient of variation (CV) is 5.81% on average.

Table 4 Intra-Assay variability

	Number of determinations	Mean value (ng/mL)	Standard deviation (ng/mL)	VC (%)
Sample 1	18	144.8	9.63	6.65
Sample 2	18	140.79	7.15	5.08
Sample 3	18	138.02	7.86	5.69

Inter-Assay and Lot-to-Lot Variance

Serum samples where measured in independent assays. Exemplary results are shown in table 5. Further, five samples were also tested repeatedly four years in eight different lots. The variability on average is 8.57% (6.8 – 10.5%).

Table 5 Inter-Assay variability

	Number of determinations	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	VC [%]
Sample 1	8	81	5.34	6.56
Sample 2	16	192	12.38	6.43
Sample 3	17	498	27.52	5.53

13.4 Linearity

Linearity was tested by dilution of native sera with different IGF-I contents (Sample 1-3). The amount of measured IGF-I was recalculated and is shown in Figure 7.

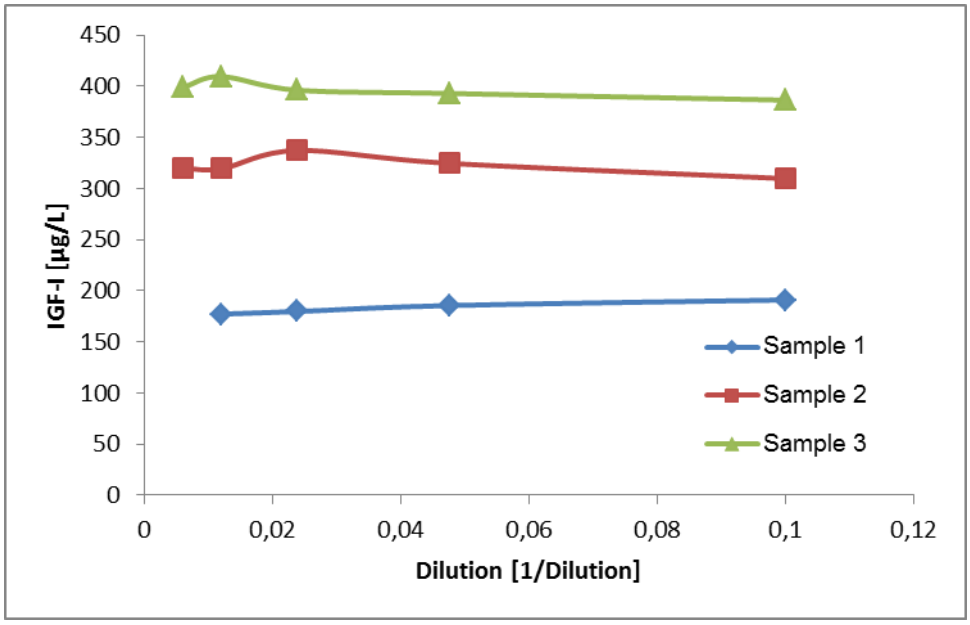


Fig. 7 Linearity, recalculated IGF-I concentrations of differentially diluted samples. The minimal dilution is 1:10, the recommended dilution is 1:21.

13.5 Recovery and Accuracy

Recombinant IGF-I was added in different amounts to human serum. The IGF-I content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched buffer calculated. Results are shown in Table 6.

Table 6 Recovery of recombinant IGF-I in human serum

IGF-I [µg/L]	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Sample	138	172	133	180
+ IGF-I 200	287	372	-	-
+ IGF-I 400	-	-	539	591
% Recovery	**85**	**100**	**101**	**102**

13.6 Trueness / Assay Calibration

Recombinant IGF-I produced by E. coli and of >98% purity (SDS-PAGE, Silverstain) is used as calibrator within the assay. The traceability of this recombinant calibration material to the international reference material of the WHO 02/254 has been proven. Results are published by Burns C et al. in Growth Horm IGF Res. 2009 Oct;19(5):457-62. Epub 2009 Mar 20. Mediagnost E20 ELISA is coded by 14c.

The reference material includes **8.5 µg/ampoule** IGF-I measured by amino acid analysis and HPLC. Mediagnost E20 immunoassay (assay No. 14c) measures **11.55 µg/ampoule**. The mean of all tested immunoassays is 11.61 µg/ampoule.

Thus, Mediagnost results are comparable to other immunological tests for measurement of IGF-I and can easily be transformed to WHO 02/254 by a factor of **0.735**.

13.7 Interference

Interference of bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing IGF-I. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 7 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides exert any influence on the measurement of IGF-I in human serum.

Table 7 Interference of physiologic substances on IGF-I measurement. Human serum samples were enriched with different amounts of trigylcerides, bilirubin or hemoglobin and the recovery of IGF-I was measured. Here the relative recovery in [%] of not enriched samples is shown.

	Triglyceride 100 mg/mL	**Bilirubin 200 µg/mL**	**Hemoglobin 10 mg/ml**
Serum 1	93	90	97
Serum 2	100	101	110
Serum 3	120	120	104

Influence of binding proteins on IGF-I measurement was exemplarily elucidated with IGFBP-3.

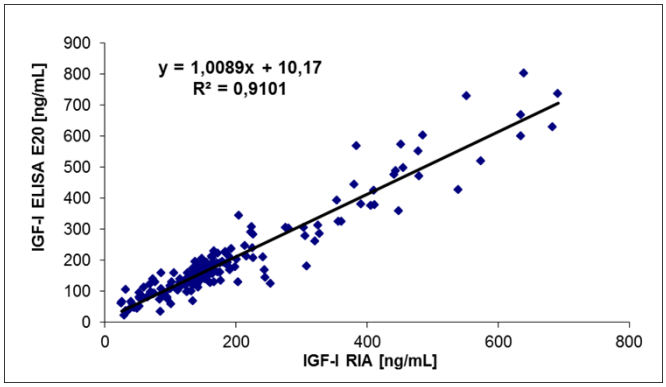
Different amounts of IGF-I and 3 or 6 mg/L of IGFBP-3 were added to sample buffer (pH 2) and phosphate based saline buffer (pH 7.4). After a short incubation of 15 minutes at room temperature these samples were diluted and applied to the Mediagnost E20 as described in the package insert. In case of sample buffer IGFBP-3 up to 6 mg/L did not interfere with IGF-I measurement. But without acidification of the sample a strong interference of IGFBP-3 with IGF-I measurement was detected (Table 8).

Table 8 Interference of IGFBP-3 with IGF-I measurement

IGFBP-3	**Sample Buffer**		
	50 µg/L IGF-I	**100 µg/L IGF-I**	**300 µg/L IGF-I**
-	46.38	116.14	358.1
3 mg/L	47.33	115.83	384.15
6 mg/L	52.32	123.38	355.41
IGFBP-3	**Phosphate buffered Saline**		
	50 µg/L IGF-I	**100 µg/L IGF-I**	**300 µg/L IGF-I**
-	34.2	90.23	349.04
3 mg/L	7.4	12.16	152.14
6 mg/L	7.2	10.12	48.15

14 ASSAY COMPARISON

Mediagnost E20 IGF-I was compared with the Mediagnost R20 IGF-I. 196 serum samples were measured in both assays and an excellent coefficient of correlation was shown with r = 0.95. Additionally, the Mediagnost IGF-I ELISA E20 was compared with an Enzyme-Immunoassay of other commercially available IGF-I test and a correlation of R^2>0.9 was shown.



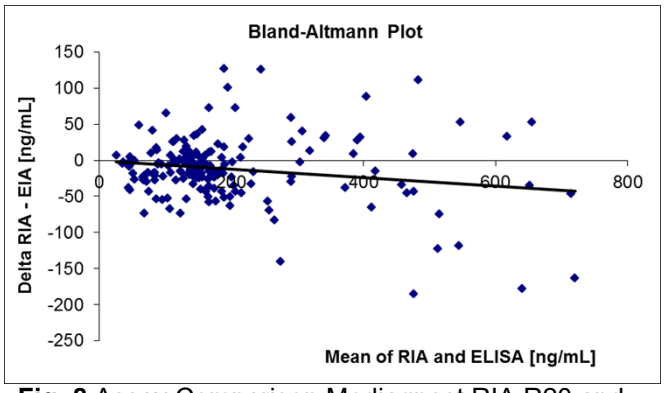


Fig. 8 Assay Comparison Mediagnost RIA R20 and Mediagnost ELISA E20

Instructions for use for scientific application

15 SCIENTIFIC APPLICATION

IGF-I is present in low concentrations in various body fluids and in conditioned cell culture media of many cell lines. However, the determination of IGF-I in these specimens is particularly difficult due to the presence of IGFBPs usually in excessive amounts. The IGFBP-blocked IGF-I ELISA avoids these problems and allows the simple, correct and sensitive IGF-I determination in numerous samples with minimal expenditure of time.

15.1 Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, cerebrospinal and urine samples, as well as in cell culture media. The IGF-I levels can vary considerable, the optimal dilution must be found out by the customer. Recombinant IGF-I could be measured in **1:2 in Sample Puffer SB diluted urine, cerebrospinal fluid** and **in cell culture media**, if species cross reactivity was taken into account (FCS supplemented media).

Measurement of IGF-I in cell lysates is possible. A suitable lysis buffer might be: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 30 mM Sodium Pyrophosphate/ 50mM Sodium Fluoride/ 100 µM Sodium Orthovanadate/ 1 mM PMSF/ 1% Triton X-100.
But the amount of intracellular IGF-I is also crucial: if it is too low (0.09 ng/mL or 0.9 ng/mL in case of 1:10 dilution), the sensitivity of the assay might not be sufficient.
The measurement must be validated for each different tissue as well as for each different cell line. If there is no IGFBP expression in the respective tissue or cell line, the dilution might be skipped and the cell lysate can be used as sample. For method validation we recommend to use recombinant IGF-I and the lysis buffer as well as some cell lysate for recovery experiments.
A reference publication measuring IGF-II in cell lysate and cell culture supernatant is available: Mohlin S, Hamidian A, Påhlman in NEOPLASIA, 2013, Volume 15 No 3.

15.2 Cross reactions with animal samples

Several commercially available animal sera have been used as samples in this assay and therewith it is proven, that the test can be used as heterologous assay for IGF-I measurement in serum samples of primates, cattle, pig, sheep, horse, donkey, goat, dog, cat, rabbit and guinea pig. For the determination of IGF-I in chicken, rat and mouse sera is this kit not usable.

Species specific calibration has to be done by the user.

To determine exact species-specific IGF-I concentrations, the test system must be calibrated respectively: for example, using bovine IGF-I in a known concentration.

16 LITERATUR / REFERENCES

Literature

1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. Adv Clin Chem.25:49-115
2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocr Rev. 10:68-91
3) Spencer EM (Ed.) 1991 Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors. New York: Elsevier.
4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. Endocrinology. 112:2215-2217.
5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. J Biol Chem. 253:2769-2276.
6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concen-tration of somatomedin C. Clin Endocrinol Metab. 13:113-143.
7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. Acta Endocrinol (Copenh). 121:751-752.
8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. J. Clin Endocrinol Metab. 74:1215-1216.
9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. J Biol Chem. 261:8754-8760.
10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). EMBO J. 8:2497-2502.
11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.J. Clin Invest. 60:648-657.
12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. J Lab Clin Med. 109:355-363.
13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. J Endocrinol. 128:347-357.
14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. J Clin Endocrinol Metab. 51:781-788.
15) Ranke MB (ed.): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents, Basel, Karger, 2003, pp 166-199
16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. J Pediatr. 109:428-433.
17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C.N.Engl J Med. 301:1138-1142
18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. J Clin Invest. 68:1321-1330.
19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence. Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. J Clin Endocrinol Metab. 55:147-153.
21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. Acta Endocrinol (Copenh).118:374-380.

22) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. J Clin Endocrinol Metab Vol 82, 4:1301-1303
23) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. Horm Res 54:60-68
24) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. Horm Res 55:155-124
25) Address NIBSC: Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertford EN 6 3 QG, Great Britain
26) Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. (2009) The first International Standard for Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: Preparation and calibration in an international collaborative study. Growth Hormone & IGF Research (2009)
27) Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. Growth Regulation 4 (Suppl. 1):11-19
28) Ranke MB, Osterziel KJ, Schweitzer R, Schuett B., Weber K., Röbbel P, Vornwald A, Blumenstock G, Elmlinger MB (2003) Reference Levels of Insulin-Like-Growth Factor I in the Serum of Healthy Adults: Comparison of Four Immunoassays. Clin Chem Lab Med Vol 41(10):1329-1334

17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION

International Test Description

CAL A-E	**Rec in 500 µL SB**	**-**
CTR1	**Rec in 500 µL SB**	**1:21 SB**
CTR2	**Rec in 500 µL SB**	**1:21 SB**
WB 20x	**-**	**1:20 A. dest. ➔ WB 1:20**
SPE		**1:21 SB**
-	**°C 20-25°C,** ↔ **max. 2 h**	

80 µl	**DET**	A1 - End
20 µl	**SB**	A1/A2
20 µL	**CAL A (2 ng/ml)**	B1/B2
20 µL	**CAL B (5 ng/ml)**	C1/C2
20 µL	**CAL C (15 ng/ml)**	D1/D2
20 µL	**CAL D (30 ng/ml)**	E1/E2
20 µL	**CAL E (50 ng/ml)**	F1/F2
20 µL	**CTR1 1:21 SB**	G1/G2
20 µL	**CTR2 1:21 SB**	H1/H2
20 µL	**SPE 1:21 SB**	
TAPE		
1 h °C 20-25°C ↔ 350 rpm		
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**EC**	
TAPE		
0.5 h °C 20-25°C ↔ 350 rpm		
5x 300 µL	**5x WB 1:20**	
100 µL	**S**	
15 min °C 20-25°C		
STP		
MEASURE		

18 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		**Reconstitution:**	**Dilution**
CAL A-E	**Calibrators**	in **500 µL** Sample Buffer **SB**	-
CTR1	**Control 1**	in **500 µL** Sample Buffer **SB**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
CTR2	**Control 2**	in **500 µL** Sample Buffer **SB**	**1:21** with Sample Buffer **SB**
WB	**Washing Buffer conc.**		**1:20** with **Aqua dest.** ➔ **WB 1:20**
Samples + Controls CTR1 and CTR2: dilute 1:21 in Sample Buffer SB, mix immediately, incubate max. 2h. Use 20 µl for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature **(20-25°C)**.			

Assay procedure in double determination		
Pipette	**Reagents**	**Position**
80 µL	Antibody Conjugate **DET**	in **all** wells used
20 µL	Sample Buffer **SB** (Blank)	A1/A2
20 µL	Calibrator **A** (**2 ng/mL**)	B1/B2
20 µL	Calibrator **B** (**5 ng/mL**)	C1/C2
20 µL	Calibrator **C** (**15 ng/mL**)	D1/D2
20 µL	Calibrator **D** (**30 ng/mL**)	E1/E2
20 µL	Calibrator **E** (**50 ng/mL**)	F1/F2
20 µL	Control **CTR1** (1:21 diluted)	G1/G2
20 µL	Control **CTR2** (1:21 diluted)	H1/H2
20 µL	Sample (1:21 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the cover foil.		
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20/ well**	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate **EC**	In each well
Cover the wells with the cover foil.		
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and **wash** 5 x with **300 µL** each Washing Buffer **WB 1:20/ well**	In each well
100 µL	Substrate **S**	In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stop Solution **STP**	In each well
Measure the absorbance within 30 min at **450 nm** with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

Copy of the page 31.